

201419075A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（精神障害分野）

DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

平成26年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 大森 哲郎

平成27(2015)年 5月

目次

I. 総括研究報告

DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

大森哲郎 ----- 1

II. 分担研究報告

1. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

中村 純 ----- 7

2. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

森信 繁 ----- 11

3. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—：治療反応性と病態解析

久住一郎 ----- 16

4. DNAメチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成—双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して—

関山敦生 ----- 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 28

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 34

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
— 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して —

主任研究者 大森哲郎 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授

研究要旨

本研究は、白血球をサンプルとして DNA メチル化修飾変化を網羅的に解析し、変化を見出した複数のメチル化サイトを組み合わせ、うつ病の診断マーカーを作成することを目的とする。メチル化修飾解析に加え、特定遺伝子 mRNA 発現などを第 2 の指標軸として設定する。これらの工夫により生物学的マーカーの弱点となりがちな患者群と対照群のオーバーラップの回避を狙うとともに、双極、単極、難治性の区別を視野に入れている。平成 26 年度までの研究により、17 種のメチル化サイトの組み合わせで、うつ病と健常者の識別が可能であることを明らかにし、特許を出願し（特願 2014 - 161176）、論文発表した。また、5 種の遺伝子 mRNA 発現の組み合わせによっても高い精度でうつ病と健常者の識別が可能であることを示し、特許を出願し（特願 2014 - 035813、PCT/JP2015/051107）、論文が受理されている。患者負担は少量の採血のみなので、臨床現場で使用しやすいマーカーとなりうる。網羅的解析を起点とするが、最終的には少数の測定指標に絞り込める見通しであり、安価かつ安定した実用可能なマーカーを目指している。

分担研究者

中村 純	産業医科大学医学部・教授
森信 繁	高知大学医学部・教授
久住一郎	北海道大学大学院・教授
関山敦生	先端医療振興財団 先端医療センター研究所・チームリーダー

A. 研究目的

うつ病を健常者から分ける診断指標の確立は、その早期発見と治療導入を可能とする。しかし、うつ病には異種性があり、双極と単極では治療方針が異なり、

前者には気分安定薬が後者には抗うつ薬が第一選択薬となる。しかも単極うつ病には、抗うつ薬に反応せず電気痙攣療法が有効な一群がある。診断指標はそれらを区別するものが望ましい。本研究は、

治療反応の異なつたうつ病の鑑別が可能な診断指標を確立することを目的とする。研究代表者らは白血球をサンプルとして網羅的メチル化修飾解析により統合失調症を健常者から区別する所見を認め (Kinoshita 他. 2013)、うつ病ではこれと異なる所見を得た。また、研究分担者 (森信) らは、うつ病に特有の BDNF 遺伝子メチル化修飾変化を報告している (Fuchikami 他. 2011)。本研究は、これらの所見を発展させ、DNA メチル化修飾変化を組み合わせたうつ病の診断マーカーを作成することを目的としている。並行して、mRNA 発現解析などを利用した判別も検討する。患者負担は最終的には数 ml の採血に抑えることができることは、実用化において大きな利点となる。

B. 研究方法

文書による同意を得た患者を対象として、診断確定と重症度評価を行い、10-20ml の静脈血を採血した。末梢白血球からフェノール・クロロホルム法で抽出するゲノミック DNA をメチル化解析に、PAXgene Blood RNA キットを用いて精製する total RNA を mRNA 発現解析に供する。血漿を BDNF とサイトカインの測定に供する。

網羅的および選択的 DNA メチル化解析に関しては、抽出したゲノミック DNA を、**Infinium HumanMethylation450 Beadchip** (Illumina 社)を用いて、広範囲

の遺伝子 CpG サイトのメチル化修飾状態を調べた。解析は外部に委託した。網羅的解析によって差異の見出されたメチル化サイトの一部に関しては PyroMark を用いて検証した。

特定遺伝子 mRNA 発現は大森らの既報の方法で解析する。PCR アレイは、ABI 社の TaqMan array plate (96well) に候補遺伝子と内因性コントロール (GAPDH, HPRT, ACTB, B2M) を搭載し duplicate で測定した。

大用量情報からのデータ抽出には、バイオインフォマティクス専門の石井一夫東京農工大学特任教授 (研究協力者) の協力を得た。

(倫理面への配慮)

研究の目的、方法、危険性、得られる結果、及びその情報の管理について説明し、書面で同意を取得する。研究参加を断っても診療上なんらの不利もないことを十分に説明する。サンプルは連結可能匿名化してプライバシーを保護する。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および平成 27 年度から施行される「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守する。研究計画は各施設の倫理委員会において承認を受けている。

C. 研究結果

平成 25 年度および 26 年度における DNA メチル化修飾変化を指標とする研究では、

うつ病 20 名と対照 19 名の第一集団 (39 名) において、メチル化アレイを用いて診断間にメチル化レベルに差異のある遺伝子サイトを同定した。それらのサイトの内、17 種類のサイトを用いた判別分析法を行ったところ、うつ病群と対照群の 2 群にサンプルを区別することができた。同じ 17 種類のサイトを用いてうつ病 12 名と対照 12 名の第 2 集団 (24 名) で検証を行ったところ再現性のある結果を得られた。これらの成果は Epigenetics (Numata et al. 2015) に掲載され、国内特許を出願し (特願 2014 - 161176)、国際特許を出願準備中である。服薬の影響について予備的に検討したところ、うつ病急性期例服薬例においても判別が可能であった。双極性障害についても、まず治療中の患者サンプルを解析したところ、単極性うつ病とは別の変化を見出している。

網羅的解析によって変化の見られた遺伝子メチル化サイトのいくつかについて PyroMark を用いて検討したところ、GSK3- β のひとつサイトにおいてうつ病患者のメチル化が低下し、これと対応して GSK3- β の mRNA 発現は増加し、両変化の程度は逆相関していた。

また、mRNA 発現解析を指標とする研究では、うつ病 25 名と対照 25 名の第一集団において PCR アレイを用いて診断間に mRNA レベルに差異のある遺伝子を同定し

た。判別に必要な最少限の遺伝子を検討したところ、それらの内、5 種類で十分であることが判明し、感度 80%特異度 92% でサンプルをうつ病群と対照群に区別することができた。同じ 5 種類の遺伝子を用いてうつ病 20 名と対照 18 名の第 2 集団で検証を行ったところ感度 85%特異度 89%となり、再現性のある結果を得られた。これらの成果について、25 年度に十数種類の遺伝子 mRNA を使用する方法で国内特許を申請していたが (特願 2014 - 035813)、26 年度には特許内容を修正するとともに国際特許も出願し (PCT/JP2015/051107)、論文が J Psychiatr Res (Watanabe et al. 2015) に印刷中となっている。カスタム化アレイに搭載する遺伝子を再検討し、双極性障害における検討を準備している。

D. 考察

平成 26 年度の研究では、平成 25 年度に引き続き、網羅的方法を用いて単極のうつ病の遺伝子メチル化変化を検討した。その結果、健常対照者と比較して、低メチル化を認めるサイトを数多く認めた。そのうちの統計学的有意差の大きい 17 種の遺伝子メチル化サイトを利用することにより、うつ病と健常対照との区別が可能であった。この 17 種のメチル化変化を用いた判別方法は、独立した別のうつ病集団に対しても再現性があった。論文発表し (Numata et al. Epigenetics 2015)、国内特許を出願し (特願 2014 - 161176)、

国際特許を出願準備中である。予備的検討から、うつ病急性期例服薬例においても判別が可能であることが判明し、服薬の影響は受けないことが示唆された。また双極性障害ではうつ病とは異なる変化が認められた。

最近、白血球をサンプルとするメチル化修飾変化の解析において、白血球成分の補正を行う手法が開発されているので、これを導入する必要性も検討を要する。幼小児期の環境、現在の環境、抗うつ薬や気分安定薬の服薬の有無などがメチル化修飾に与える影響についてもできるかぎり明確化しなくてはならない。研究結果は、新たな病態解明の糸口を拓いた点において学術的意義も高い。

また、PCR アレイによる mRNA 発現を指標とする診断マーカーでは、平成 25 年度において、13 種の mRNA 発現を組み合わせた指標を作成し、高精度でうつ病を識別することができた。この指標は、独立した別集団においても高い精度でうつ病を判別できた。平成 26 年度の検討によって 5 種で十分であることが判明し、特許内容を修正するとともに国際特許も出願し（PCT/JP2015/051107）、論文が J Psychiatr Res (Watanabe et al. 2015) に印刷中となっている。

メチル化修飾変化は比較的安定度が高く、採血、抽出、保存などの影響を受けにくく、疾患マーカーとして扱いやすい。

mRNA も特定チューブで採血することによって、どこの診察室でも簡便に安定化できる。本研究で測定する各指標の解析は、技術的進歩によって次第に安価で迅速となっている。

E. 結論

うつ病の診断マーカー確立の試みはデキサメサゾン抑制試験をはじめとこれまでにも数多い。しかし、単一の測定値での判別はうつ病群と対照群のオーバーラップを避けることが難しく、そのため感度と特異度に限界が生じた。本研究では、複数の遺伝子サイトのメチル化修飾変化や複数の遺伝子の mRNA 発現を複合して指標とすることによって、高い感度と特異度を持つ指標の開発を目指している。平成 26 年度までの研究成果において、メチル化解析においても mRNA 発現解析においても、単極うつ病と健常者の間の区別がこれまでにない高い精度で可能であることを示し、論文発表し、特許を取得した。

これらの結果は DNA メチル化修飾変化および mRNA 発現を利用した実用的な診断マーカーの作成が可能であることを示唆している。現時点では、うつ状態においてのみ見られる所見 (state-dependent) か、回復後にも持続する所見 (trait-dependent) かはまだ不明である。うつ病の病態との関連も今後の検討課題である。

本研究は、高度の先端技術を応用した企

画であるが、患者負担は一度の少量の採血のみなので、臨床現場で使用しやすい指標とすることができる。網羅的解析を起点とするが、最終的には数十以内の測定指標に絞り込む見通しであり、今後の測定技術の進歩と相まって、安価かつ安定した指標とすることができる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（主任研究者分のみ）

1. 論文発表

Watanabe SY, Iga JI, Ishii K, Numata S, Shimodera S, Fujita H, Ohmori T. Biological tests for major depressive disorder that involve leukocyte gene expression assays. *J Psychiatr Res*. 2015 doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.03.004. [Epub ahead of print]

Numata S, Ishii K, Tajima A, Iga JI, Kinoshita M, Watanabe S, Umehara H, Fuchikami M, Okada S, Boku S, Hishimoto A, Shimodera S, Imoto I, Morinobu S, Ohmori T. Blood Diagnostic Biomarkers for Major Depressive Disorder using Multiplex DNA Methylation Profiles: Discovery and Validation. *Epigenetics*. 10(2):135-41,2015 doi: 10.1080/15592294.2014.1003743.

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi

K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Takeda M, Ohmori T. Aberrant DNA Methylation of Blood in Schizophrenia by Adjusting for Estimated Cellular Proportions. *Neuromolecular Med*. Dec;16(4):697-703,2014 doi: 10.1007/s12017-014-8319-5.

Watanabe S, Iga J, Nishi A, Numata S, Kinoshita M, Kikuchi K, Nakataki M, Ohmori T. Microarray analysis of global gene expression in leukocytes following lithium treatment. *Hum Psychopharmacol*. 29(2):190-8,2014 doi: 10.1002/hup.2381.

2. 学会発表

Numata S, Kazuo I, Tajima A, Iga JI, Kinoshita M, Watanabe S, Umehara H, Fuchikami M, Okada S, Shimodera S, Imoto I, Morinobu S, Ohmori T. Blood diagnostic biomarkers for major depressive disorder using DNA methylation profiles. *Neuroscience*, Washington DC, 2014.11.18

Inoshita M, Numata S, Tajima A, Kinoshita M, Imoto I, Ohmori T. Sex differences of blood in DNA methylation. *Neuroscience*, Washington DC, 2014.11.18

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Nishi A, Imoto I, Ohmori T. Blood homocysteine and schizophrenia evaluated by a Mendelian

randomization analysis. Neuroscience,
Washington DC, 2014.11.17

Watanabe S, Iga J, Numata S,
Shimodera S, Fujita H, Ishii K, Ohmori
T. Leukocyte gene expression-based
diagnostic test for major depressive
disorder: A pilot and replication study.
29th CINP World Congress of
Neuropsychopharmacolog, Canada,
2014.6.24

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願2014 - 161176 平成26年8月7日
気分障害マーカーおよびその用途、な
らびに統合失調症マーカーおよびそ
の用途
大森哲郎、沼田周助 他

2) 国際特許出願番号

PCT/JP2015/051107 平成 27 年 1 月
16 日
精神疾患マーカーおよびその用途
大森哲郎、伊賀淳一 他

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
— 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して —

分担研究者 中村 純 産業医科大学精神医学 教授

研究要旨

脳由来神経栄養因子は神経可塑性(BDNF)に関与する重要な分子の一つである。BDNF は血液脳関門を通過する。うつ病では血小板および脳内からの BDNF 分泌が低下しており、健常者と比較して有意に血中(血漿・血清)BDNF 濃度が低値である。BDNF はその前駆物質である proBDNF から合成されるが、proBDNF もまた生理活性を有する。すなわち、BDNF が TrkB 受容体に結合してシナプス可塑性に関与するのに対して、proBDNF は P75 受容体に結合して神経細胞死(アポトーシス)に関与する。すなわち、BDNF と proBDNF は神経に対して全く逆の作用をする(陰陽仮説)。以上のことから考えると、うつ病では血中 BDNF が低下、proBDNF が増加している可能性がある。本研究では、うつ病患者の proBDNF, BDNF の血清濃度を比較した。さらに、選択的セロトニン再取り込み阻害薬やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬単剤治療による治療の血清 BDNF, proBDNF への影響も検討した。

研究協力者

吉村 玲児	産業医科大学医学部・准教授
堀 輝	産業医科大学医学部・助教
香月 あすか	産業医科大学医学部・助教
阿竹 聖和	産業医科大学医学部・助教

A. 研究目的

うつ病では血中 BDNF が低下、proBDNF が増加している可能性がある。本研究では、うつ病患者の proBDNF, BDNF の血清濃度を比較した。さらに、選択的セロトニン再取り込み阻害薬やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬単剤治療による治療の血清 BDNF, proBDNF への影響も検討する。

B. 研究方法

対象：88 例の DSM-IV-TR で大うつ病性障害(MDD)の診断基準を満たす drug-naïve 患者(M/F: 39/49, Age<mean ±s.d.: 34±17 yr)と 108 例の健常対象者(HC)(M/F: 42/66, Age<mean ±s.d.: 38±19 yr)である。抑うつ状態の症状評価にはハミルトンうつ病評価尺度(17 項

目)(HAMD17)を用いた。全例抗うつ薬単剤治療が行われた。投与された薬物は fluvoxamine 32 例、paroxetine 26 例、milnaciprane 10 例、sertraline 10 例、duloxetine 10 例であった。血清 BDNF, proBDNF 測定：血清 BDNF および proBDNF 測定は ELISA 法にて行った。BDNF は ELISA kit (SK00572-06, Adipo Bioscience, Santa Clara, CA, USA)、proBDNF は ELISA kit (SK00572-01, Adipo Bioscience, Santa Clara, CA, USA)を用いた。測定は duplicate で行い平均値を求めた。統計解析：2 群間のパラメーター比較には student's t-test、2 群間のパラメーター相関検定には Pearson's correlation、血清 BDNF, proBDNF の時間経過による変化の検定には one-way ANOVA 法を用いた。本研究は産業医科大学倫理委員会の承認を受けており、被験者からは文書による同意を得た。

C. 研究結果

(1)血清 BDNF 濃度は両群とも全例で測定することが出来た。血清 proBDNF 濃度は MDD 群で 72/88 例(81.8%)、HC 群で 93/108 例(86.1%)で測定することが出来た。(2)血清 BDNF 濃度は MDD 群では HC 群と比較して有意に低値であった。(HC 群: 12881 ± 5878 pg/ml, MDD 群: 8081 ± 3886 pg/ml, $t=3.287$, $p=0.0024$, $1-\beta=87.3\%$) (2)血清 proBDNF 濃度は 2 群間で差はなかった。(HC 群: 11649 ± 9149 pg/ml, MDD 群: 10382 ± 8568 pg/ml, $t=-0.891$, $p=0.861$) (3)baseline の HAMD17 得点と血清 BDNF 濃度には負

の相関があった。(r=-0.481, p=0.041)。(4)baseline の HAMD17 得点と血清 proBDNF 濃度は関連がなかった。(r=0.061, p=0.783)。(5)MDD 群では抗うつ薬投与 4 週間後に 49/88 例(55.6%)が反応した。(HAMD17 得点で 50%以上の改善)(6)抗うつ薬への反応群と非反応群(HAMD17 得点で 50%未満の改善)で baseline proBDNF($t=0.081$, $p=0.436$)と BDNF 濃度($t=-0.062$, $p=0.690$)に差はなかった。(7)抗うつ薬投与前、投与 2 週間後、投与 4 週間後の血清 BDNF 濃度($F=1.618$, $p=0.813$)および proBDNF 濃度($F=2.390$, $p=0.091$)に差は認められなかった。

D. 考察

今回の研究結果は MDD 患者では、HC と比較して血中(血清・血漿)BDNF 濃度が低下しているという我々の先行研究やメタ解析結果¹⁾をリコンファームした。MDD では、血中(血清・血漿)BDNF 濃度が低下していることは、うつ病の biological marker (state marker)として感度は高いが特異度は低い。血清 proBDNF 濃度は両群間に差がなかった。しかし、血清 proBDNF は ELISA kit 使用によるアッセイ方法では、その validity に問題がある可能性がある。したがって、より検出感度の高い ELISA kit や Western Blot 法を用いての再検討が必要である。(現在他の ELISA kit を用いて検討中である。)一方、Zhou ら²⁾は、血清中 proBDNF 濃度が HAMD 得点と正の相関を示すことを報告している(2014)。この報告は、MDD では血清 proBDNF が

増加する可能性を示唆している。今回の結果ではbaseline BDNF濃度と抗うつ薬の反応には差はなかった。一方で、baseline BDNF濃度の高いMDD患者では抗うつ薬への反応が早いとの報告がある¹⁾。抗うつ薬投与は血清BDNF濃度を少なくとも4週間では増加させなかった。この結果は我々の先行研究結果³⁾と一致した。最近、難治性うつ病に対する即効性が期待されているketamineもBDNFへの作用が強く血漿BDNF濃度を6時間で増加させることが報告されている⁴⁾。今回の検討から、血清proBDNF濃度がMDD患者で増加するという知見は得られなかった。さらに、抗うつ薬投与は血清proBDNFに影響を与えなかった。今回の結果の解釈として、測定方法(ELIZA法)の問題や血清BDNFほどproBDNFはうつ状態を鋭敏には反映しない可能性などが考えられる。

E. 結論

- (1) MDD患者ではHC群より血清BDNF濃度が低下していた。
- (2) MDD患者とHC群に血清proBDNF濃度に差はなかった。
- (3) 抗うつ薬への反応はbaseline BDNF濃度、proBDNF濃度に依存しない。
- (4) 抑うつ症状の重症度と血清BDNF濃度は相関する。
- (5) 抗うつ薬の4週間投与は血清BDNFや血清proBDNF濃度を変化させない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi K, Yoshimura R, Kakeda S, Kishi T, Abe O, Umene-Nakano W, Katsuki A, Hori H, Ikenouchi-Sugita A, Watanabe K, Ide S, Ueda I, Moriya J, Iwata N, Korogi Y, Kubicki M, Nakamura J:

COMT gene Val158Met, but not BDNF Val66Met, is associated with white matter abnormalities of the temporal lobe in patients with first-episode, treatment-naïve major depressive disorder: A diffusion tensor imaging study.

Neuropsychiatric Disease and Treatment, Jun 25; 10:1183-1190, 2014

Yoshimura R, Kishi T, Hori H, Atake K, Katsuki A, Nakano-Umene W, Ikenouchi-Sugita A, Iwata N, Nakamura J:

Serum proBDNF/BDNF and response to fluvoxamine in drug-naïve first-episode major depressive disorder patients.

Annals of General Psychiatry 9: 13-19, 2014

Yamanouchi Y, Sukegawa T, Inagaki A, Inada T, Yoshio T, Yoshimura R, Iwata N, and SCAP study co-operation group: Clinical study evaluating individually safe correction of antipsychotic agent polypharmacy in Japanese patients with schizophrenia: Validation of the

safety correction for antipsychotic polypharmacy and high-dose method. International Journal of Neuropsychopharmacology, in press, 2014

Ikeda M, Yoshimura R, Hashimoto R, Kondo K, Saito T, Shimasaki A, Ohi K, Kawamura Y, Nishida N, Miyagawa T, Sasaki M, Takeda M, Nakamura J, Ozaki N, Iwata N:

Genetic overlap between antipsychotic response and susceptibility for schizophrenia.

Journal of Clinical Psychopharmacology, in press, 2014

Nishimura J, Kakeda S, Abe O, Yoshimura R, Watanabe K, Goto N, Hori H, Sato T, Takao H, Kabasawa H, Nakamura J, Korogi Y:

Plasma levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol are associated with microstructural changes within the cerebellum in the early stage of first-episode schizophrenia- a longitudinal VBM study

Neuropsychiatric Disease and Treatment, 10 : 2315-2323, 2014

Hori H, Yoshimura R, Katsuki A, Atake K, Nakamura J

Relationships between brain-derived neurotrophic factor, clinical symptoms, and decision-making in chronic schizophrenia: data from the Iowa Gambling Task.

Front Behav Neurosci. 2014 Dec 4;8:417.

Hori H, Yamada K, Kamada D, Shibata Y, Katsuki A, Yoshimura R, Nakamura J.

Effect of blonanserin on cognitive and social function in acute phase Japanese schizophrenia compared with risperidone.

Neuropsychiatr Dis Treat. 2014 Mar 26;10:527-33.

Atake K, Yoshimura R, Hori H, Katsuki A, Nakamura J

Catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype and the clinical responses to duloxetine treatment or plasma levels of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and homovanillic acid in Japanese patients with major depressive disorder

Neuropsychiatr Dis Treat. 2015 Apr 3;11:967-74.

2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成
— 双極、単極、治療抵抗性うつ病の識別を目指して —

分担研究者 森信 繁 高知大学医学部神経精神科学 教授

研究要旨

うつ病は ICD-10 或いは DSM-V にて診断されるが客観性に乏しく、客観的な診断バイオマーカーの開発が望まれている。うつ病発症には遺伝要因のみならず環境要因の密接な関与が提唱されおり、環境要因により可塑的に変化して遺伝子の転写を調節するエピジェネティック機構の、精神疾患発症メカニズムへの関与が期待されている。このような観点から、精神疾患の診断あるいは治療薬反応性のバイオマーカーとして、末梢血由来 DNA のメチル化プロファイルの解析が注目されている。初年度の脳由来神経栄養因子(BDNF)メチル化研究に引き続き、今年度はうつ病の病態に関与し抗うつ薬の標的分子であるセロトニン・トランスポーター(SLC6A4)遺伝子およびセロトニン 2C 受容体(5-HT2c)遺伝子の、エクソン I 上流及びエクソン I 内の CpG アイランドのメチル化プロファイルの解析を行った。BDNF 遺伝子とは異なり、SLC6A4 遺伝子及び 5-HT2c 遺伝子のメチル化プロファイルは、うつ病診断のバイオマーカーには適していないことがわかった。しかしながら BDNF 遺伝子とは異なり、SLC6A4 遺伝子の CpG 76 のメチル化率は、選択的セロトニン再取り込阻害薬 (SSRI) による治療反応率との間に有意な相関を示すことが分かった。同時に SLC6A4 遺伝子の CpG 3, 76 のメチル化率は、幼少期の不遇な出来事と相関することも明らかとなった。5-HT2c 遺伝子のメチル化率は、SSRI による治療反応率あるいは幼少期の不遇な出来事との間に、有意な相関を示さなかった。

A. 研究目的

うつ病は世界での障害調整生命年低下要因の第二位にランクされ、自殺との密接な関与も指摘され、適切な診断や治療法の確立が必須の問題となっている。うつ病は ICD-10 或いは DSM-V にて診断されるが、客観性に乏しく診断バイオマーカーの開発が望まれている。一卵性双生児のうつ病発症一致率は最大 40% であり、うつ病発症には遺伝要因のみならず環境因の密接な関与が提唱されている。同時に、大規模 GWAS の Manhattan

Blot の結果をみても、うつ病発症に特異的な SNP は検出されておらず、うつ病発症に関与する環境因の重要性が改めて注目されている。

近年、環境因により可塑的に変化して遺伝子の転写を調節するエピジェネティック機構の解明から、精神疾患発症の環境因として DNA メチル化の変動が注目されている。初年度の研究では、うつ病の病態に関与し抗うつ薬の標的分子である脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子に注目し、エクソン I 上流及びエクソン

I内のCpGアイランドのメチル化の解析を行い、診断及びうつ病重症度のマーカーとしての検討を行った。その結果、BDNF 遺伝子メチル化プロファイルは未治療うつ病の診断バイオマーカーとして有用であることがわかったが、選択的セロトニン再取り込阻害薬(SSRI)の治療反応性を予測するサロゲートマーカーとしては妥当でないこともわかった。

このため本年度の研究では BDNF 遺伝子と同様に、うつ病の病態に密接な関与が示され抗うつ薬の標的分子でもある、セロトニン・トランスポーター(SLC6A4)遺伝子及びセロトニン2C受容体(5-HT2c)遺伝子のエクソンI上流及びエクソンIを含む領域にある CpG アイランドのメチル化プロファイルを解析し、新たな診断バイオマーカーの開発や治療反応性を推測できるサロゲートマーカーの開発を試みた。

B. 研究方法

未治療うつ病患者 50 名及び健常対照者 50 名を対象に、末梢血を採取した。うつ病群では SSRI 治療開始後 6 週の時点で、第 2 回目の採血を行った。うつ病の診断は DSM-IV-TR を用いて行った。うつ病の重症度は HAM-D (Hamilton Rating Scale for Depression) で、幼少期ストレスは ETISR-SF (Early Trauma Inventory Self Report-Short Form) で評価した。SSRI によるうつ症状の改善率は、HAM-D 評価を基にした以下の計算式によって算出した。

$$\text{改善率} = \frac{\text{治療前 HAM-D} - \text{治療後 HAM-D}}{\text{治療前 HAM-D}}$$

末梢血よりの genomic DNA の抽出は、DNeasy (Quiagen)を用いて行った。その後の DNA メチル化解析は、SEQUENOM 社の MassARRAY® System を用いて行った。システム内の sodium bisulfite 処理キットを用い、非メチル化シトシンのウラシルへの置換を行った。University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser と Genbank より取得した、SLC6A4, 5-HT2c 遺伝子の遺伝子のエクソンI上流及びエクソンI内に存在する CpG アイランド領域の情報から、各 CpG アイランドをカバーする複数の PCR 用プライマーを MassARRAY® System 上の Epidesigner を用いて設計した。SLC6A4 遺伝子の解析領域は Chr 17: 28562388 - 28563189 で、この中にある 81 ヶ所の CpG を対象とした。5-HT2c 遺伝子の解析領域は Chr X: 113818520 - 113819453 で、この中にある 85 ヶ所の CpG を対象とした。Methylation specific PCR 後、In vitro transcription を施行した。U 特異的切断の後、MassARRAY® MALDI-TOF MS を用いて DNA メチル化を質量分析法にて定量した後、EpiTyper を用いて DNA メチル化のデータを取得した。メチル化プロファイルによる群間分類は階層的クラスタリング法で、うつ病群と健康対照群における各 CpG メチル化率の群間差は Mann-Whitney U test で、各 CpG メチル化率と ETISR-SF 得点や改善率との相関は Spearman rank correlation test で解析した。

C. 研究成果

SLC6A4 遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内の各 CpG のメチル化率を用いた階層的クラスター解析から、SLC6A4 遺伝子メチル化プロファイルではうつ病群と健康対照群を分類できないことが明らかになった。今回の解析でメチル化率の計測できた 29 ヶ所の各 CpG のメチル化率の 2 群間での比較では、うつ病群治療前と健康対照群との間に有意な差のある CpG はみられなかった。うつ病群治療後と健康対照群との比較では、唯一 CpG 3 のメチル化率が健康対照群と比べて有意に増大していた。SLC6A4 遺伝子の CpG 76 のメチル化率と HAM-D 総得点との間に、有意な相関がみられた。SLC6A4 遺伝子の CpG 3 のメチル化率と HAM-D による改善率との間に、有意な相関がみられた。SLC6A4 遺伝子の CpG 3, 76 のメチル化率と ETISR-SF 総得点との間に、有意な相関がみられた。

5-HT2c 遺伝子のエクソン I 上流及びエクソン I 内の各 CpG のメチル化率を用いた階層的クラスター解析から、うつ病群と健康対照群は 2 群に分類できないことが明らかになった。5-HT2c 遺伝子の CpG メチル化率と HAM-D 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。5-HT2c 遺伝子の CpG メチル化率と HAM-D による改善率との間に、有意な関連はみられなかった。5-HT2c 遺伝子の CpG メチル化率と ETISR-SF 総得点との間に、有意な関連はみられなかった。

D. 考察

本年度の研究結果から、SLC6A4 遺伝子および 5-HT2c 遺伝子のエクソン I 及びエクソン I 内の CpG アイランドにある CpG のメチル化プロファイルの解析を行っても、未治療うつ病群と健康対照群を分類することはできないことが明らかとなった。本年度の解析結果は、SLC6A4 遺伝子および 5-HT2c 遺伝子のメチル化プロファイル解析が、BDNF 遺伝子のメチル化プロファイル解析と異なり、うつ病の診断バイオマーカーにはなりえないことを示唆している。しかしながら初年度の BDNF 遺伝子のメチル化解析では 35 個の CpG のメチル化率が全く HAM-D を用いたうつ病重症度との間に関連を示さなかったのに対して、SLC6A4 遺伝子の CpG 76 のメチル化率はうつ病重症度との間に有意な正の相関を呈しており、この結果は CpG 76 のメチル化率がうつ病の重症度評価に有用であることを示唆していると考えられる。同様に BDNF 遺伝子のメチル化率の解析では全ての CpG のメチル化率は HAM-D を用いたうつ症状の改善率との間に有意な関連を示さなかったのに対して、SLC6A4 遺伝子の治療前の各 CpG メチル化率の解析から CpG 3 のメチル化率は改善率と有意な正の相関を示すことがわかった。この結果は、治療前の CpG 3 のメチル化率が SSRI によるうつ病治療反応性を予測するサロゲートマーカーになりうる可能性を示唆している。

幼少期の不遇な環境を評価する ETISR-SF 総得点は、SLC6A4 遺伝子の CpG3, 76 のメチル化率と有意な正の相

関を示すことが本年度の解析結果から得られた。この結果は多くの疫学研究から幼少期の不遇な環境がうつ病発症の危険因子と報告されている点を考えると、SLC6A4 遺伝子のメチル化率はうつ病発症脆弱性のバイオマーカーとして有用であることが考えられる。

初年度及び本年度の研究結果からうつ病の診断バイオマーカーの開発という点で考察すると、BDNF 遺伝子のメチル化プロファイルが該当すると考えられる。しかしながらうつ病に対する SSRI 治療の反応予測性というサロゲートマーカーには、BDNF 遺伝子ではなく SLC6A4 遺伝子のメチル化率の解析が有用であると考えられる。

このような結果は、うつ病の病態形成に密接に関与している遺伝子と、うつ症状の発現に密接に関与している遺伝子は異なることが示唆され、メチル化によるうつ病マーカーを探索する上では、診断マーカーとサロゲートマーカーとを分けて研究していく必要があると思われる。ただし、サロゲートマーカーに関してはわずかに SLC6A4 遺伝子の CpG 3 のみの結果であるため、今後は抗うつ薬の標的分子と考えられるその他の遺伝子のメチル化の変動と臨床症状の変化の関連を解析することを用いた、一層妥当なサロゲートマーカーの開発を目指す必要があると考えられる。

E. 結論

抗うつ病の標的分子として注目されている SLC6A4, 5-HT2c 遺伝子の、エクソン I のプロモーター領域からエクソン

I に及ぶ CpG アイランド上にある CpG のメチル化率を、未治療うつ病患者と健康対照者の末梢血から抽出した DNA を対象に MassARRAY®を用いて解析した。得られたメチル化率を階層的クラスタ解析法で解析した結果、SLC6A4, 5-HT2c 遺伝子のメチル化プロファイルではうつ病群と健康対照者群を分類できないことが明らかとなった。この結果は、SLC6A4, 5-HT2c 遺伝子のメチル化解析が、うつ病の診断マーカーとして適していないことを示していると考えられる。その一方で SLC6A4 遺伝子の CpG 3 のメチル化率が SSRI によるうつ症状改善率と有意な相関を示しており、SLC6A4 遺伝子 CpG 3 のメチル化が治療反応性を予測するサロゲートマーカーとなる可能性がわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1) Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Katoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Kokubo Y, Mimura M. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. *J Psychiatr Res.* 53: 47-53, 2014.

2) Numata S, Ishii K, Tajima A, Iga J, Kinoshita M, Watanabe S, Umehara H, Fuchikami M, Okada S, Boku S, Mishimoto A, Shomoderqa S, Imoto I, Morinobu S, Ohmori T. Blood diagnostic

biomarkers for major depressive disorder using multiplex DNA methylation profiles: discovery and validation. *Epigenetics*10: 135-141, 2015.

3) 森信 繁. 気分障害のバイオマーカー(III) うつ病・双極性障害のエピジェネティック・バイオマーカーの開発—DNAメチル化およびマイクロRNAを用いた試み—. 精神疾患のバイオマーカー. 中村 純編, 星和書店, 東京, pp143-157, 2015.

G-2. 学会発表

シンポジウム

1) 森信 繁. 外傷後ストレス障害の病態形成に関するエピジェネティック・メカニズム. 第36回日本生物学的精神医学会. 奈良, 2014.9.29-10.1.

2) 森信 繁. DNAメチル化を用いたうつ病診断バイオマーカーの開発. 第34回日本精神科診断学会. 松山, 2014.11.13-14.

一般講演

1) Okada S, Morinobu S, Fuchikami M, Segawa M, Yokomaku K, Katoka T, Okamoto Y, Yamawaki S, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T, Kokubo Y, Mimura M. The potential of SLC6A4 gene methylation analysis for the diagnosis and treatment of major depression. 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology. Vancouver, Canada, 2014.6.22-26.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業（精神障害分野）
分担研究報告書

DNA メチル化修飾に着目したうつ病のマーカー作成－双極、単極、治療抵抗性うつ病の
識別を目指して－：治療反応性と病態解析

分担研究者 久住 一郎 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座精神医学
分野教授

要旨

うつ病の発症要因は、遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子であり、それぞれが複雑に影響し合うことが多くの臨床研究により明らかになってきた。昨年度の本研究では、子供の時の虐待と気質、成人期ライフイベントの抑うつ気分に対する構造方程式モデルを一般成人で明らかにした。本年度は、大うつ病性障害(MDD)患者群と健常者群のうつ症状、子供のときの虐待、気質、成人期ライフイベントを質問紙で定量的に評価し、両群間の違いと治療抵抗性との関連を検討した。子供の時の虐待がMDD発症に影響するときに感情気質が媒介作用を有することを明らかにした。さらに、治療抵抗性MDDに子供の時の虐待、特にネグレクトが関連していることをはじめて明らかにした。今後は、DNAメチル化に及ぼす子供の時の虐待の影響と他要因との相互作用がMDD発症に関与しているか否かについて、検討していく予定である。

A. 研究目的

うつ病の発症要因は、遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子であり、それぞれが複雑に影響し合うことが多くの臨床研究により明らかになってきた。これらの4因子のうち、遺伝要因と養育環境、遺伝要因と発症前ライフイベント、人格と発症前ライフイベントの3つの組み合わせについてはうつ病発症に対して相互作用を示す(Caspi et al. Science 2003; Kendler et al. Am J Psychiatry 2004)。しかし、それ以外の3つの組み合わせ(遺伝と人格、人格と養育環境、養育環境とライフイベント)のうつ病発症に及ぼす相互作用についてはこれまで報告されていない。

うつ病発症に関与する遺伝要因は従来は出生後不変であると考えられてきた。しかし、最近DNAメチル化が幼少期のストレス(虐待)によって惹起され、遺伝子発現が出生後に修飾されることが明らかになった(Zhang et al. Neuropsychopharmacology 2013)。このことは養育環境によって遺伝要因が後天的に変化をうける可能性を示唆しており、前述した遺伝要因(G)と環境要因(E)の相互作用(G X E相互作用)が後天的な環境変化によってさらに変化しうることを意味している。

以上に紹介した最近の知見から、うつ病の病態、治療反応性に遺伝要因と虐待を含む養育環境、人格・気質、うつ病発症前のライフイベントの4つの因子がどのように相互作用を示すのかを検討することは重要であり、特に遺伝要因を

DNAメチル化の観点から研究することは遺伝と環境の相互作用の解明につながることが期待される。

昨年度の本研究では、子供の時の虐待と気質、成人期ライフイベントの抑うつ気分に対する複雑な構造方程式モデルを一般成人で明らかにし、報告した(Nakai et al. J Affect Disord 2014)。子供のときの虐待のうち、特にネグレクトが直接的にはなく、抑うつ、循環、焦燥、不安の4つ感情気質を介して間接的に一般成人の抑うつ症状を強め、これらの4つ感情気質は過去1年間のライフイベントの否定的な評価を強め、否定的なライフイベントは抑うつ気分に対して気質よりはかなり小さいが有意な悪影響を与えていた。

本年度の本研究では、うつ病患者群と健常者群の白血球中の mRNA 発現、DNAメチル化を多施設共同で検討を行うのと並行して、大うつ病性障害(MDD)患者群と健常者群のうつ症状、子供のときの虐待、気質、成人期ライフイベントを質問紙で定量的に評価し、両群間の違いと治療抵抗性との関連を検討した。平成26年度には、まず白血球を使った生物学的マーカー以外の要因について、MDD患者群と健常群で比較検討し、仮説モデルの作成、妥当性検証を行った。

B. 研究方法

募集した健常成人170名とMDD患者98名を対象として、抑うつ症状(PHQ-9)、虐待的養育環境CATS(Sanders and Becker-Lausen, Child Abuse Negl 1995)の日本語版(全38項目版)、最近1年間の

ライフイベントに対する肯定的あるいは否定的評価Life Experiences Survey (LES) (Sarason et al., J Consult Clin Psychol 1978)、感情気質である Temperament Evaluation of the Memphis, Pisa, Paris, and San Diego Autoquestionnaire (TEMPS-A) (Akiskal et al., J Affect Disord 2005)の日本語版 (Matsumoto et al., J Affect Disord 2003) による質問紙調査を行った。患者群は北海道大学病院、防衛医科大学病院、自衛隊中央病院、自衛隊札幌病院に通院中の患者を対象とした。

SPSS version 21 を使用し、各変数の相関とうつ症状に対する重回帰分析を行い、うつ症状に大きく影響する因子を抽出し、仮説モデルを作成した。M-plus version 7.11 (Muthen & Muthen) を使用し、ロバスト重み付き最小二乗法による推定法を用いた構造分析式モデリングで仮説モデルの検証を行った。

C. 研究結果

1) 健常群と MDD 群の人口統計学的特徴、臨床背景、質問紙データの単変量解析による比較

170 名の健常群は、平均年齢 44.2 歳、男性 103 例、女性 67 例、98 名の MDD 群は、平均年齢 45.6 歳、男性 65 例、女性 33 例であった。MDD 群のほうが有意に無職が多く、未婚者が多く、子供が少なかった。第一度親族における気分障害の家族歴も MDD 群で有意に多く、MDD と双極性障害の両疾患の家族歴は有意に多かった。さらに、

合併する身体疾患も MDD 群で有意に多かった。

抑うつ症状を示す PHQ-9 総点は MDD 群で有意に高かった。虐待的養育環境 CATS の合計点、亜項目である性的虐待とネグレクトの点数は MDD 群で有意に高かったが、亜項目の罰点数は両群で有意な差はみられなかった。

TEMPS-A で測定される 5 つの感情気質のうち、抑うつ、循環、不安、焦燥気質は MDD 群で有意に高かったが、発揚気質は両群で有意な差はみられなかった。

最近 1 年間のライフイベントに対する肯定的 (pLES) あるいは否定的評価 (nLES) 点数については、nLES は MDD 群で有意に高かったが、pLES は両群で有意な差はみられなかった。

2) 健常群と MDD 群の多変量ロジスティック回帰分析

以上の単変量解析により MDD 群で有意な特徴と考えられた 14 項目を独立変数、健常群か MDD 群かいなかを従属変数としてステップワイズ法による多変量ロジスティック回帰分析を行った。

その結果、PHQ-9 総点、合併身体疾患、循環気質 (TEMPS-A)、不安気質 (TEMPS-A)、無職、ネグレクトスコア (CATS) の 6 項目が有意に MDD 群で高値であった。これら 6 項目により健常群と MDD 群を精度 89.2% で判別することができた。感度 89.8%、特異度 87.9%、陽性的中率 93.5%、陰性的中率 81.6% であった。